

水田土壌中のPropionibacteriumに関する研究

著者	林 滋
号	238
発行年	1978
URL	http://hdl.handle.net/10097/16339

氏 名 (本籍)	はやし 林	しげる 滋
学 位 の 種 類	農	学 博 士
学 位 記 番 号	農 博 第	2 3 8 号
学位授与年月日	昭和 5 4 年	3 月 2 7 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当	
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農芸化学専攻	
学 位 論 文 題 目	水田土壌中の <i>Propionibacterium</i> に関する研究	

論文審査委員 (主 査)

教授 古 坂 澄 石 教授 大 平 幸 次

教授 高 橋 甫

論文内容要旨

先に、武田・古坂は、東北大学付属鹿島台水田土壌を用いて、嫌気性細菌の調査を行った。その結果、嫌気性細菌数は、好気性細菌数より一桁程低く、又偏性嫌気性細菌の中では、含窒素化合物資化性の clostridia が優占する事を明らかにした。この調査の際、彼等は5日で培養を打ち切って、細菌数の計測と単離菌の同定を行ったが、対象が土壌という複雑な場で、多種多様な微生物が生息する点を考慮すると、単離のための集落形成の培養日数が短かすぎるきらいがある。そこで本研究では、まず培養日数の検討を行い、培養日数を延長することにより、irregular rod な細菌形態を持つ *Propionibacterium* が偏性嫌気性細菌の主な member である事を始めて明らかにした。そして、この菌群が土壌中でプロピオン酸生成の主要な担い手である事を明らかにすると同時に、乳酸を主要な栄養源として使用している可能性を指摘した。

培養日数

培養を6日間と15日間に分けて細菌の計数を行ったところ、6日培養に比較し、15日間培養では2倍から30倍の高い計数値を得た。その後21日目まで培養を続けたが15日間培養で得られてくる細菌数と変りがなかった。そこで6日培養と15日培養での細菌の種構成を形態を中心にして検討した。

6日培養という短期培養では regular rod bacteria が優占していたが、15日間と培養を延長すると、regular rod の比率は減少し、かわりに irregular rod (V形, Y形, branching を有する桿状) の細菌が優占して来た。(Fig - 1)

大曲水田の嫌気性細菌の調査

このように培養日数を延長する事により、従来の調査では見い出されなかった一群の細菌株を得たので、大曲水田土壌について培養期間を15日に延長して1974年5月から11月にかけて嫌気性細菌の調査を行った。その結果、全嫌気性細菌数は、湛水後急激に増加し、2～3週間後に最大菌数に達した。その後、6・7月に一時減少し、8・9月に再び増加したが、11月にはいちぢるしく減少した。年間を通じ細菌数はグラム、乾土当り $10^6 \sim 10^8$ という値で、好気性細菌数と同数か、湛水後期にはそれをはるかに上まわっていた。偏性嫌気性細菌数の時期的変動も、全嫌気性細菌数のそれと同様のパターンを示した。細菌数では、全嫌気性細菌数より一桁程低く、グラム、乾土当り $10^5 \sim 10^7$ で変化していた。(Fig-2)

嫌気性細菌の細菌学的諸性質

この15日間培養で得られてくる。偏性嫌気性細菌群はどのような種構成から成り立っているのかを検討するため、分類学的試験に供した。形態とグラム染色性で偏性嫌気性細菌を大別したところ、3群に分かれた。(グループⅠ～Ⅲ)

単離されて来た細菌の大部分がグループⅢに属し、形態的には irregular rod でグラム染色性陽性の細菌であったため、グループⅢの細菌に注目して研究を進めた。偏性嫌気性細菌中グループⅢの占める割合を Fig-3 に示した。次にグルコース及び乳酸からの代謝産物である揮発性脂肪酸に検討を加えたところ、両基質からの主要代謝産物としてプロピオン酸を生成した。前記の性質とプロピオン酸を生成することから、グループⅢに属する細菌株を、genus *Propionibacterium* と同定した。その後さらに種々の生理試験に供した結果、*Propionibacterium* の中でも、esculine 加水分解能及び indol 生成能をもたない、*P. granulosum* と *P. lyophilum* に属する事が判明した (Table-1)。*Propionibacterium* は従来動物起源のもののみが記載されており、土壌、特に水田から単離された報告はない。さらに *Propionibacterium* の中でごく限られた species のものが優占した事は、非常に興味深い。

この菌の出現が単に大曲水田だけのものなのか否かを検討するため、他の土質の異った2・3の水田を調査した。その結果、岩沼黒泥、吉田砂質土壌からは単離され、吉田砂質土壌の場合、単離菌株中34%という高い比率を得た。但し、岩手火山灰土壌からは単離出来なかった。この事は、*Propionibacterium* の存在が大曲水田のみならずかなり広く分布することを示している。

水田土壌中における *Propionibacterium* の増殖について

次にこうして単離されて来た *Propionibacterium* が水田土壌中で何を nutrient として生育しているのかという点に検討を加えた。分類学的検討の結果から、*Propionibacterium* は高分子物質に対する資化性を持っていないので、低分子の糖、アミノ酸、脂肪酸を集積培養法を用いて検討した。糖としてはグルコース、アミノ酸としてはカザミノ酸、脂肪酸としては乳酸を湛水土壌に添加、培養し、代謝産物である揮発性脂肪酸とそこに集積して来る細菌種を調査した。(Fig-4, 5, 6, Table-2)

その結果、乳酸添加の時のみ、多量のプロピオン酸の生成と *Propionibacterium* の集積が認められ (Fig-6, Table-1)、単離菌株の74%を占め、明らかな対応関係が認められた。グルコース添加ではプロピオン酸の量もきわめて少なく、又プロピオン酸生成菌の集積も認められなかった。カザミノ酸添加の場合は、低級 iso-脂肪酸が主な代謝産物で、プロピオン酸も生成されて来るが、その量は、低級 iso-脂肪酸に比較すると少なく、又プロピオン酸生成菌の集積も認められなかった。これらの事から乳酸が水田土壌中で *Propionibacterium* の栄養源

となっている可能性が強くなって来たため、消費乳酸のうち、どれくらいがプロピオン酸に流れているかを検討した。(Fig-7)

その結果、消費乳酸のうち34%～45%がプロピオン酸になっていた。この値は土壤中の反応であることを考慮するとかなり高い値であるといえる。

こうした集積培養法と土壤中での乳酸の代謝を考えると、水田土壤中に生息している *Propionibacterium* が乳酸を主要な栄養源の一つとして生育し、プロピオン酸生成の主要な担い手として働いていることが推定される。

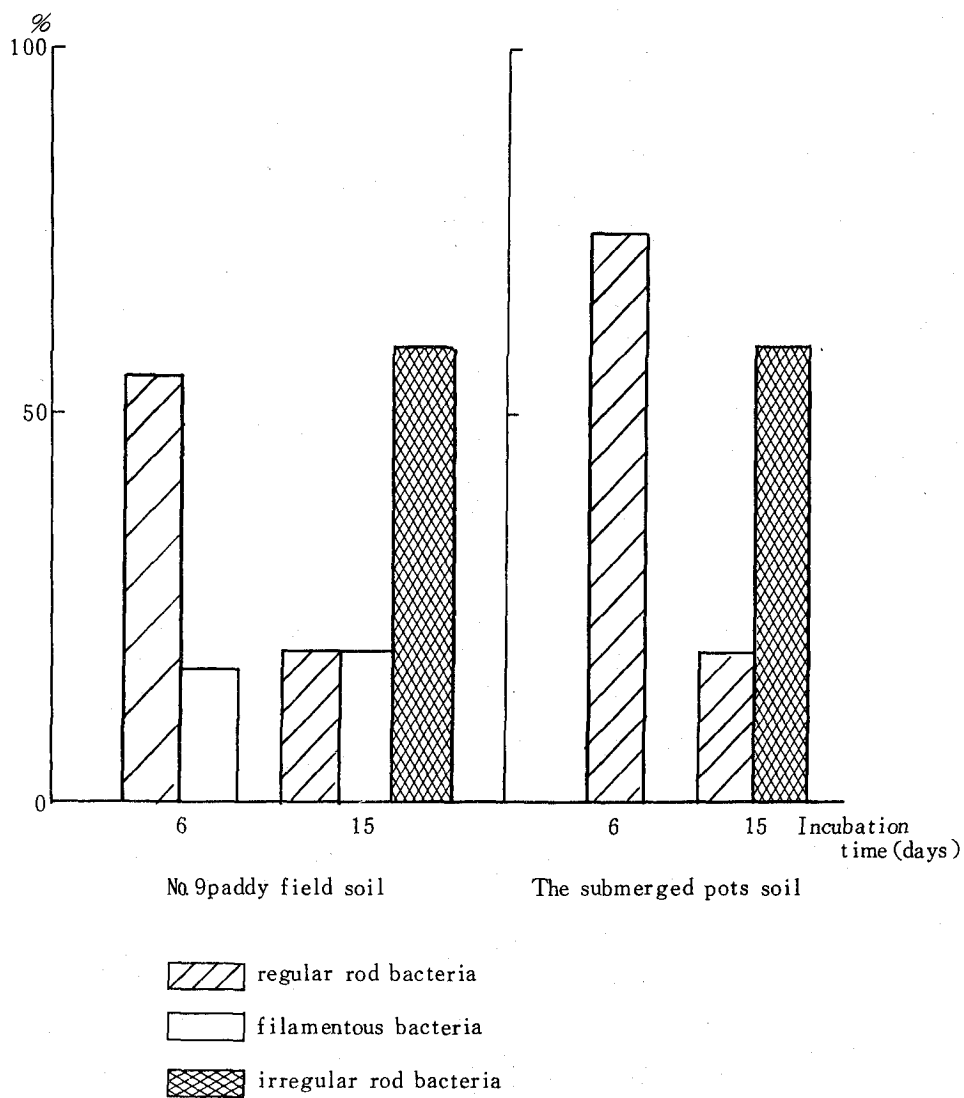


Fig-1. Changes in the composition of microflora as classified by cell forms depending on the incubation time of a isolation culture.

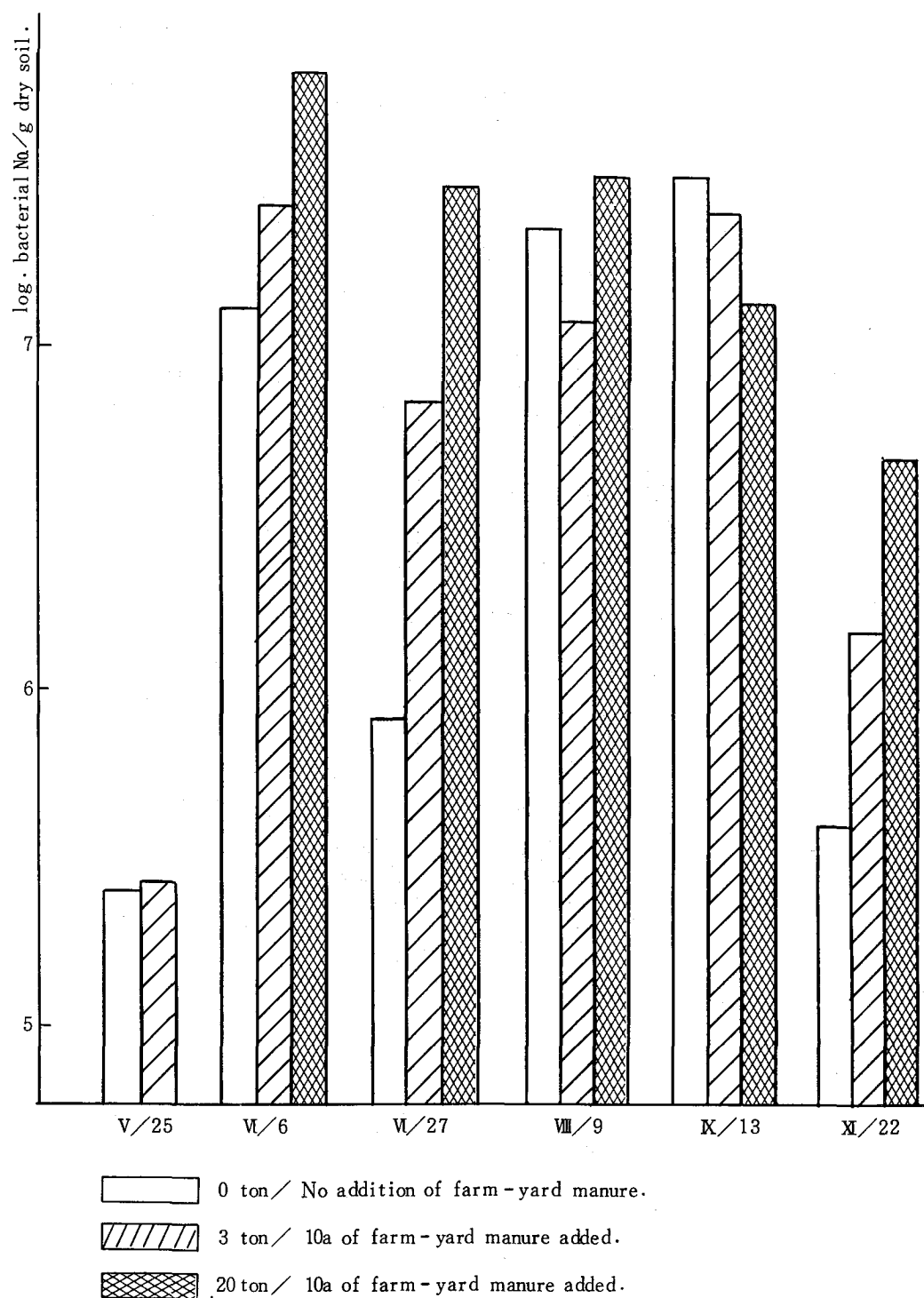


Fig-2. Seasonal changes in the counts of strict anaerobes on VL basal medium.

Sampling date.

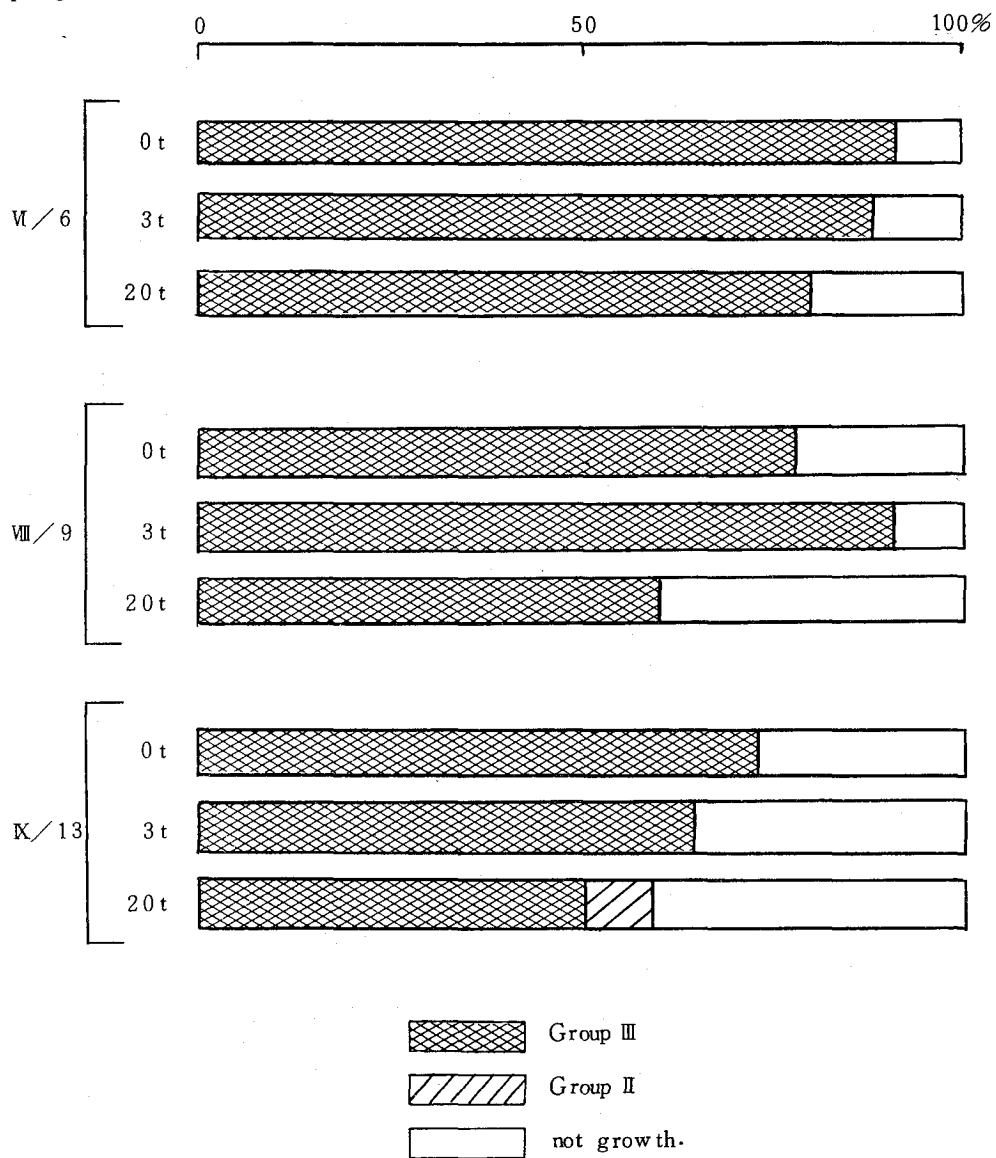


Fig-3. Composition of strict anaerobes in a paddy field soil.

Table - 1. 単離された *Propionibacterium* の性質

菌 株	グラム染色	カタラーゼ	エスクリン 加水分解	インドール 生 成	アドニット エリスリトール 資 化 性	硝酸還元	菌種
B-18	+	+	-	-	+	+	<i>P. lyphophilum</i>
D-38	+	+	-	-	+	+	
C-7	+	+	-	-	+	-	
⋮							
B-1	+	+	-	-	-	-	<i>P. granulorum</i>
D-7	+	+	-	-	-	-	
E-28	+	+	-	-	-	-	
⋮							

Table - 2. 1400 g 湛水土壤に有機物を添加した際のプロピオン酸菌数及び全嫌気性細菌数

処 理	細菌数 / g.wet soil	プロピオン酸菌 の 比 率	プロピオン酸菌数 / g.wet soil
無 添 加 (0日)	4.8×10^5	5.5 %	2.64×10^5
無 添 加 (7日目)	2×10^5	2.7 %	5.4×10^3
45g グルコース 添加(7日目)	1.36×10^6	2.7 %	3.7×10^4
10g カザミノ酸 添加(7日目)	8.6×10^6	7.5 %	6.4×10^5
6g 乳 酸 添加(7日目)	1.25×10^7	73.9 %	0.94×10^7

$\mu\text{mole in } 5g. \text{ wet soil.}$

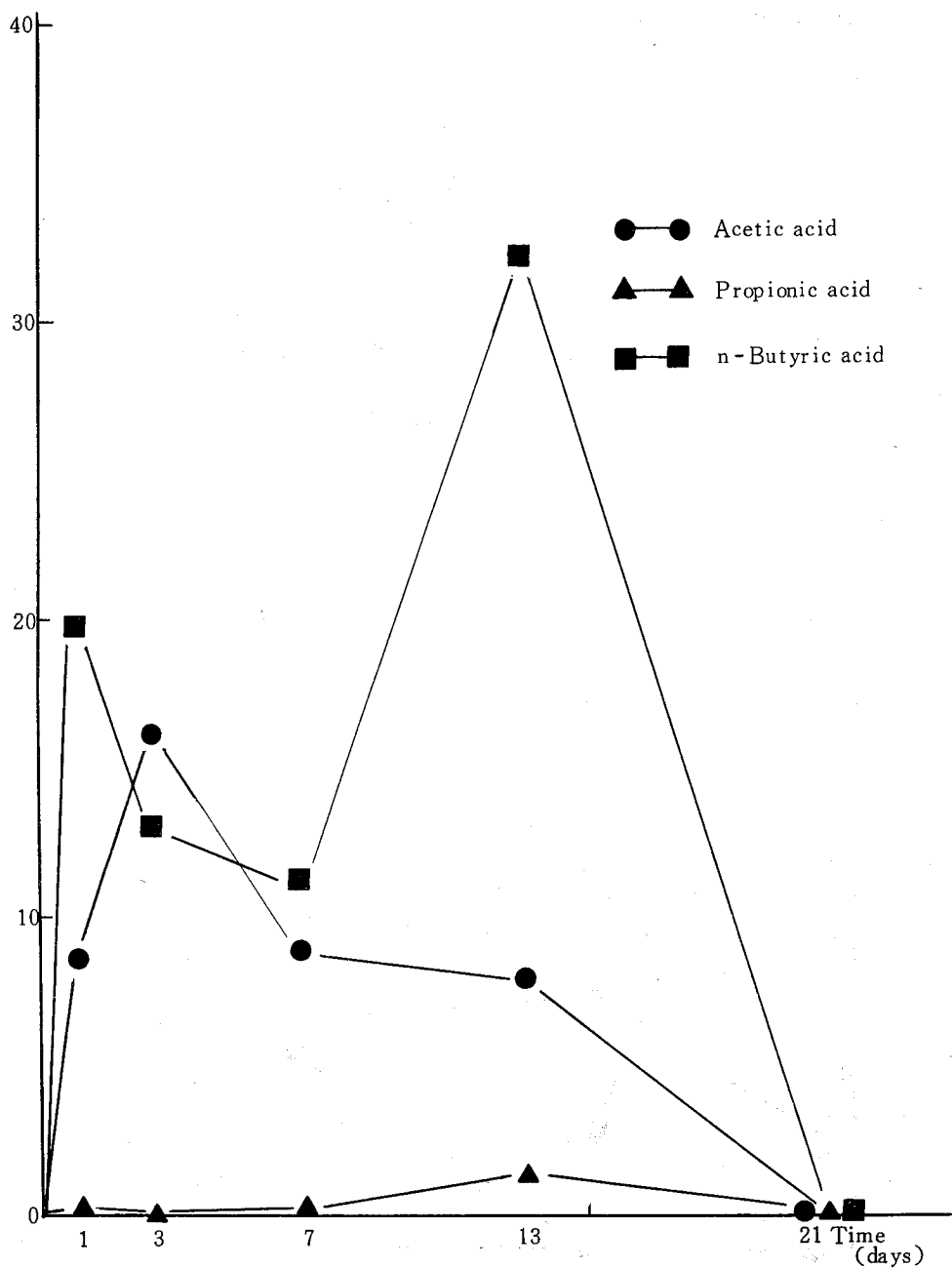


Fig-4. Volatile fatty acids production when 4.5 g glucose was added to 1400 g submerged soil.

μ mole in 5g. wet soil.

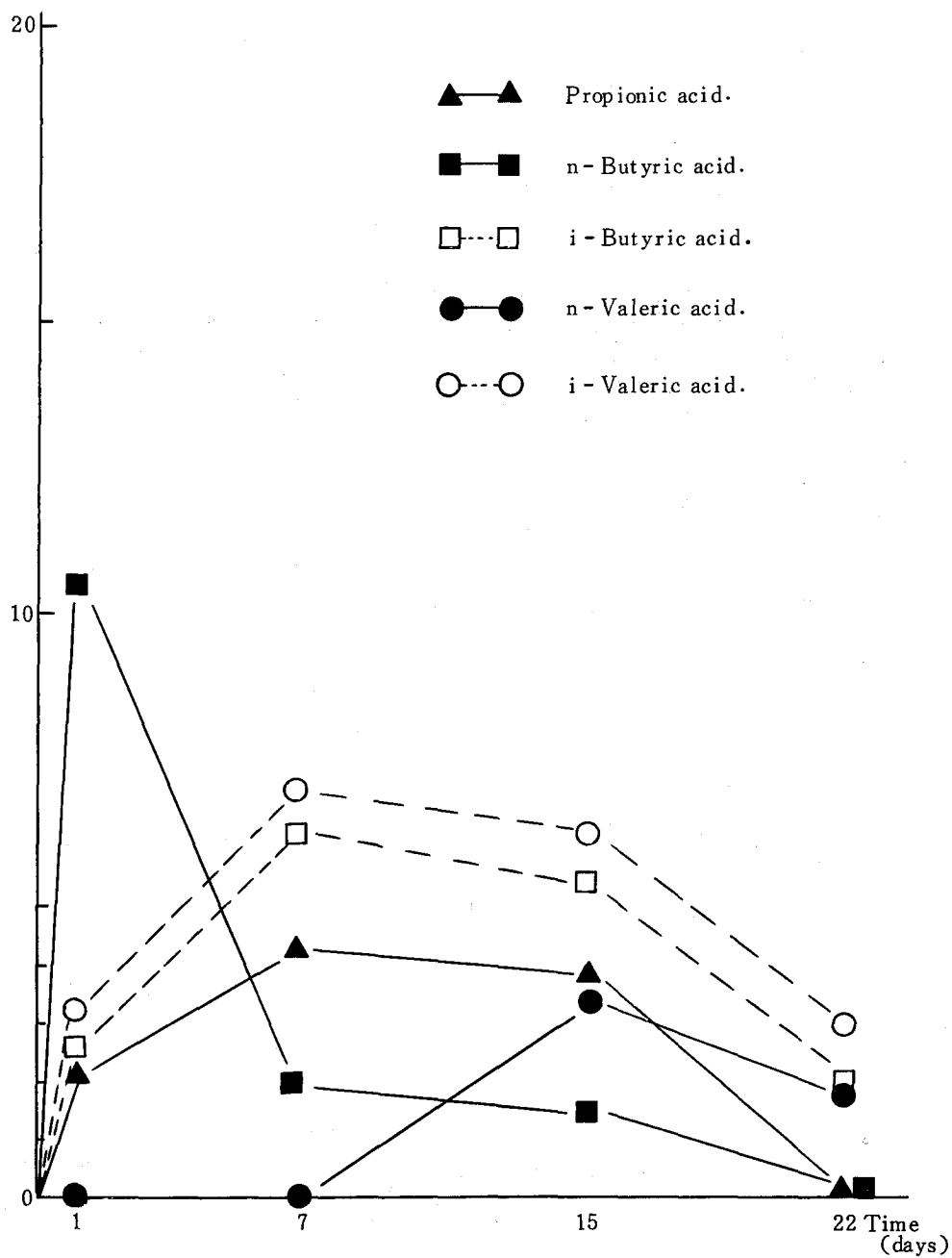


Fig- 5. Volatile fatty acids production when 10g casamino acid was added to 1400g submerged soil.

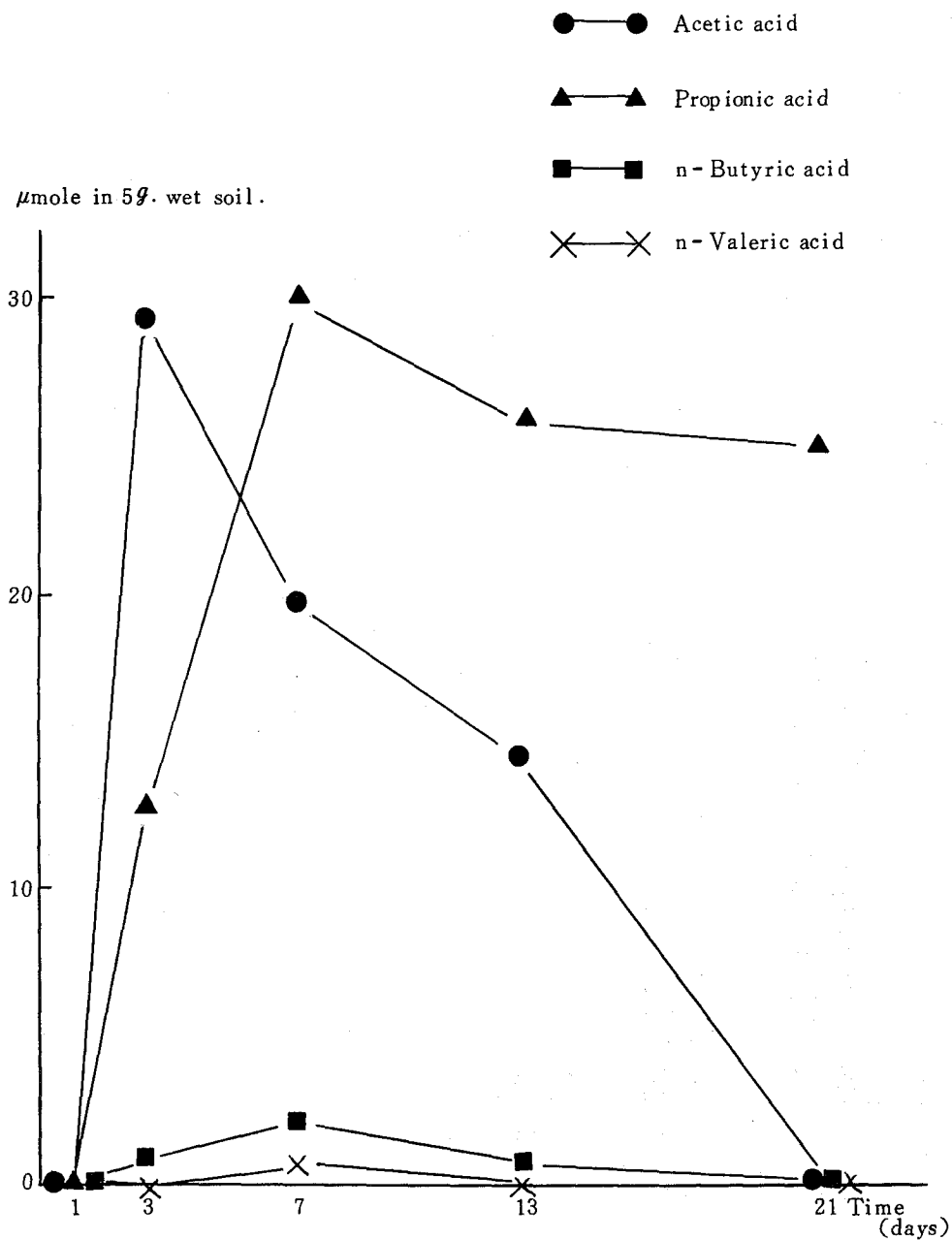


Fig- 6. Volatile fatty acids production when 6 g Na - lactate was added to 1400 g. submerged soil.

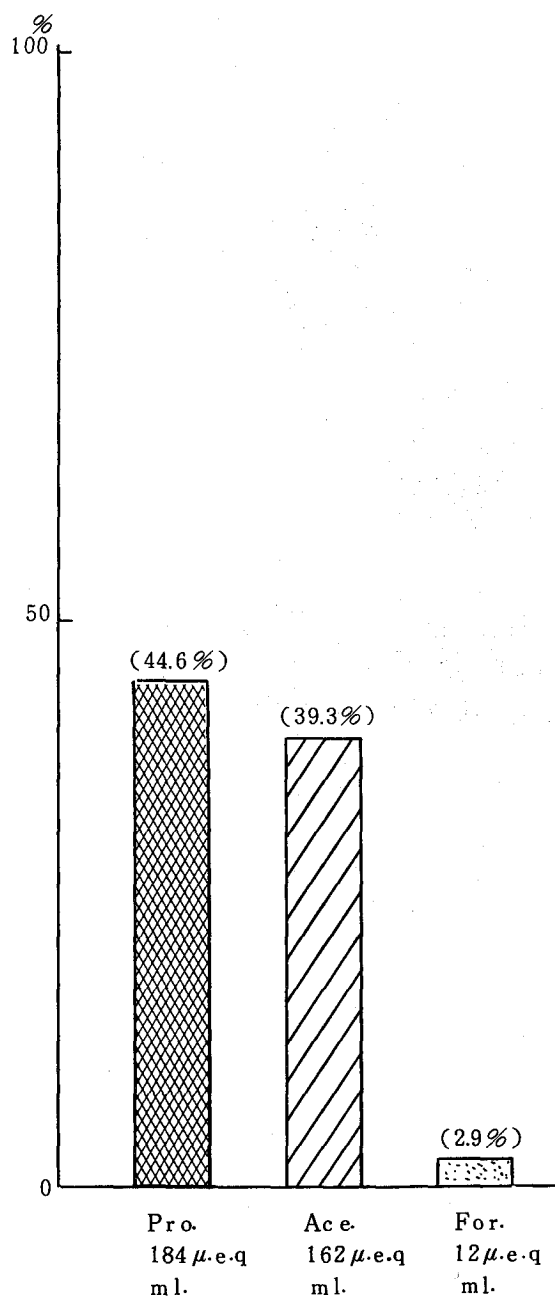


Fig - 7. The percentage of fatty acids produced from lactate consumed.

審 査 結 果 の 要 旨

水田土壤は湛水すると嫌気的条件下に追い込まれるといわれながらも、そこに存在する嫌気性細菌については、硫酸還元菌や *Clostridium* 属菌等についてのいくつかの研究があるにすぎない。

本研究は水田土壤中に存在する細菌フロアの研究の一環として偏性嫌気性の *Propionibacterium* の存在を明らかにすると共に、その水田土壤中での生育のための基質は乳酸であることを推定したものである。

以下にその概要を述べる。まず、大曲水田土壤についてロールチューブ法を用いて、嫌気性細菌数の時期的変動を検討した。その際培養日数を15日間とすると、偏性嫌気性菌（通性嫌気性菌を含む）数は $10^5 \sim 10^7$ とこれまでの報告の値を1桁上廻った。また、その菌種内容について検討を加え、その主体をなすものが *Propionibacterium granulosum* と *P. lyphophilium* であることを明らかにした。*Propionibacterium* 属菌はこれまで動物起原のもののみが知られていたが、水田土壤中にも数多く存在することを明らかにしたものは本研究が始めてである。

ついで集積培養の手法を用いて *Propionibacterium* の土壤中での増殖のための基質について検討した。土壤からの単離菌株は高分子化合物を資化できないことから、グルコース、カザミノ酸および乳酸塩をそれぞれ土壤に添加培養して、その際成立する嫌気性細菌フロアを分析した。その結果乳酸塩添加の場合にのみ *Propionibacterium* 属菌が優占し、土壤中に *Propionic acid* を蓄積した。このことから *Propionibacterium* 属菌は水田土壤中では乳酸塩を資化して優占する可能性の高いことを指摘した。

以上の結果は農学博士の学位の学位を授与するにふさわしいものと判断した。